

**PROTOCOLOS DE OBTENCIÓN, CONSERVACIÓN
Y ENVÍO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS**

**ESTUDIO TRASLACIONAL PROSPECTIVO DE
DETERMINACIÓN DE FACTORES PREDICTIVOS DE
EFICACIA Y TOXICIDAD EN PACIENTES CON CÁNCER**

SEOM
Sociedad Española
de Oncología Médica

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.	3
2	SUERO Y DNA.	5
2.1	SUERO	5
2.2	DNA	6
3	ORINA	8
4	LÍQUIDO ASCÍTICO Y PLEURAL	9
5	CONSERVACIÓN Y ENVÍO DE LAS MUESTRAS.	10

1 INTRODUCCIÓN.

El objetivo de este protocolo es proporcionar una herramienta de trabajo que permita obtener, procesar, conservar y enviar las muestras del *Estudio traslacional prospectivo de determinación de factores predictivos de eficacia y toxicidad en pacientes con cáncer*, promovido por SEOM, garantizando la calidad de las muestras y su homogeneidad entre los distintos centros participantes.

El protocolo ha sido elaborado por el Grupo de Investigación Traslacional (GIT) de SEOM, en colaboración con personas con amplia experiencia en el procesamiento y gestión de muestras. Permite la determinación de distintos factores moleculares en las muestras, incluyendo entre otros:

- citoquinas solubles (ELISA, Luminex, etc)
- estudios sobre DNA, incluyendo determinaciones de polimorfismos, PCR, secuenciación, etc
- estudios sobre RNA en suero y microRNA circulante
- metabolitos y proteínas de uso convencional y experimental

Los protocolos se han adaptado para facilitar su empleo en un número amplio de centros y se revisarán y actualizarán en función de la evolución del Estudio Traslacional. Aunque la calidad de las muestras obtenidas empleando estos protocolos ha sido validada, ni SEOM ni el Grupo de Investigación Traslacional pueden hacerse responsables de los posibles problemas derivados del uso de estos protocolos. Si precisa alguna aclaración, desea sugerir modificaciones o añadir algún protocolo adicional que permita realizar nuevos estudios en muestras de pacientes, por favor comuníquelo a través de git@seom.org

El uso de estos protocolos es libre, incluso en proyectos no vinculados al Estudio Traslacional promovido por SEOM, aunque el GIT recomienda que los estudios en muestras de pacientes con cáncer se vinculen a este proyecto. El GIT también recomienda establecer colaboraciones con los Servicios de Bioquímica o con los Biobancos del propio centro para incorporar o adaptar estos protocolos a su actividad habitual y poder solicitar la obtención de las muestras de la misma forma que se solicita una analítica convencional. Esto facilitará la realización de estudios en muestras de pacientes.

2 SUERO Y DNA.

2.1 Suero

1. La extracción de sangre se realizará en un tubo de suero de 10 ml (tubo con gelosa, tapón marrón).
2. Es muy importante intentar procesar la sangre en las dos horas posteriores a la extracción.
3. Obtener 2 tubos de 10 ml de sangre y dejarla reposar durante 15-20 minutos a temperatura ambiente hasta que se forme el coágulo.
4. Centrifugar el tubo a 1500 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Con una micropipeta, recoger el suero en alícuotas de 500 μ l en tubos tipo Eppendorf. Obtener tantas alícuotas como sea posible en función de la cantidad de suero. El número de alícuotas condicionará el número de estudios que puedan realizarse. Se recomienda realizar al menos 5 alícuotas. No desechar muestra, aunque la última alícuota contenga un volumen menor de 500 μ l.
6. Desechar el coágulo de células restante
7. Identificar cada alícuota para su almacenaje, con:
 - el tipo de muestra: suero.

- un código de identificación (predeterminado por centro y serie clínica)
- la fecha de extracción
- la fecha de nacimiento del paciente

Se recomienda emplear una etiquetadora tipo LABPAL (MARCA Brady) y cubrir la etiqueta con cinta adhesiva de celofán, para evitar que se deteriore durante el almacenamiento.

8. Guardar las muestras inmediatamente después del alicotado y etiquetado, en un congelador a -80 °C. Se debe llegar a este punto del protocolo antes de las 2 primeras horas tras la extracción. Si ello no es posible, se puede guardar la muestra en nevera (4°C) hasta 24 horas, pero se deberá especificar en la etiqueta de la muestra que no se ha procesado en menos de 2 horas.
9. Registrar la muestra en la base de datos prevista con los datos del apartado anterior y con los datos de identificación del paciente (los datos del paciente no deben salir del centro).

2.2 DNA

1. La extracción de sangre se realizará en un tubo de EDTA de 10ml (tapón morado). Es preferible procesarla inmediatamente, pero si no es posible puede mantenerse en la nevera a 4°C hasta 24 horas.
2. Fraccionar con una micropipeta la sangre entera en alícuotas de 2 mililitros. El número de alícuotas condicionará el número de estudios que puedan realizarse. Se recomienda hacer 5 alícuotas.
3. Identificar cada alícuota para su almacenaje, con:

- el tipo de muestra: DNA
- un código de identificación (predeterminado por centro y serie clínica)
- la fecha de extracción
- la fecha de nacimiento del paciente

Se recomienda emplear una etiquetadora tipo LABPAL (MARCA Brady) y cubrir la etiqueta con cinta adhesiva de celofán, para evitar que se deteriore durante el almacenamiento.

4. Guardar las muestras inmediatamente después del alicuotado y etiquetado, en un congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
5. Registrar la muestra en la base de datos prevista con los datos del apartado anterior y con los datos de identificación del paciente (los datos del paciente no deben salir del centro).

3 ORINA.

1. Obtener orina de primera micción de la mañana recogida en frasco estéril. Recoger la parte intermedia de la micción, no la orina inicial.
2. Centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Mediante una pipeta, hacer alícuotas de 5 ml con el sobrenadante. Se recomienda hacer al menos 5 alícuotas.
4. Identificar cada alícuota para su almacenaje, con:
 - el tipo de muestra: orina
 - un código de identificación (predeterminado por centro y serie clínica)
 - la fecha de extracción
 - la fecha de nacimiento del paciente

Se recomienda emplear una etiquetadora tipo LABPAL (MARCA Brady) y cubrir la etiqueta con cinta adhesiva de celofán, para evitar que se deteriore durante el almacenamiento.

5. Registrar la muestra en la base de datos prevista con los datos del apartado anterior y con los datos de identificación del paciente (los datos del paciente no saldrán del centro).
6. Guardar las muestras inmediatamente después del alicuotado y etiquetado, en un congelador a -80 °C. Se debe llegar a este punto del protocolo antes de las 6 primeras horas tras la extracción.

4 LÍQUIDO ASCÍTICO Y PLEURAL.

1. Centrifugar la muestra a 3.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
2. Mediante una pipeta, hacer alícuotas de 5 ml con el sobrenadante. Se recomienda hacer al menos 5 alícuotas.
3. Identificar cada alícuota para su almacenaje, con:
 - el tipo de muestra: líquido ascítico, pleural, etc.
 - un código de identificación (predeterminado por centro y serie clínica)
 - la fecha de extracción
 - la fecha de nacimiento del paciente

Se recomienda emplear una etiquetadora tipo LABPAL (MARCA Brady) y cubrir la etiqueta con cinta adhesiva de celofán, para evitar que se deteriore durante el almacenamiento.

4. Registrar la muestra en la base de datos prevista con los datos del apartado anterior y con los datos de identificación del paciente (los datos del paciente no saldrán del centro).
5. Guardar las muestras inmediatamente después del alicuotado y etiquetado, en un congelador a -80 °C. Se debe llegar a este punto del protocolo antes de las 6 primeras horas tras la extracción.

5 CONSERVACIÓN Y ENVÍO DE LAS MUESTRAS.

1. Guardar las muestras inmediatamente después del alicuotado y etiquetado, en un congelador a -80 °C con control de temperatura.
2. Es muy importante evitar la congelación y descongelación de las muestras al manipularlas, tanto de las que se van a enviar como de las que permanecen congeladas.
3. El envío se realizará en contenedores adecuados para material biológico que garantice que no salga la muestra en caso de rotura. No se deben emplear tubos de vidrio porque se pueden romper.
4. Enviar las muestras en hielo seco, evitando ante todo su descongelación. El Grupo de Investigación Traslacional preparará un protocolo de envío de muestras próximamente.
5. Es preferible enviar todas las muestras de un centro de una vez, cuando se hayan obtenido todas las muestras que conformen la serie.